

海带“901”配子体 DNA 随机扩增反应条件的优化^{*}夏 鹏^{1,2} 杨迎霞³ 刘升平³ 赵玉山³ 段德麟^{1**}⁽¹⁾ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)⁽²⁾ 中国科学院研究生院 北京 100039)⁽³⁾ 烟台东方海洋开发有限公司 烟台 265618)

摘要 用小规模提取法从海带“901”品系的配子体中提取基因组 DNA, 用于随机扩增多态 DNA(RAPD)的重复性及稳定性研究。通过对扩增体系中各因子和扩增程序的梯度试验, 确定其优化反应体系为: 50 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 引物, 1.5 U Taq 酶; 所得 PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min, 45 个循环: 变性 94 ℃ 30 s, 退火 36 ℃ 1 min, 延伸 72 ℃ 2 min, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。本研究条件获得的 RAPD 图谱有较好的重复性和特异性, 为深入研究海带“901”品系的遗传和变异提供了方法依据。

关键词 海带“901”, 配子体, 随机扩增多态 DNA**中图分类号** Q311 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0022-05

自从 80 年代中后期 Mullis 创立了聚合酶链式反应 (Polymorase Chain Reaction) 以来^[1], 分子生物学方法与技术发展迅速。特别是从 90 年代建立的随机扩增 DNA 多态性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术已在海洋生物中得到了广泛的应用^[2]。在藻类研究中, 主要用于种质鉴定、杂交及遗传分析、遗传突变的检测和遗传图谱的构建。现在已知对大型的经济海藻海带、紫菜、龙须菜的研究有报道^[3-5], 但对海带的遗传与变异的分子机理尚未见报道, 主要因为遗传机制不清楚, 遗传性状不稳定, 海带优良品系较难获得。海带“901”品系是从 1990 年开始, 经 5 年的努力培育出来的^[6]。它是由日本长海带 (*Laminaria longissima*) 为母本和早厚成品系一号 (*L. japonica*) 为父本, 通过杂交获得的 F₁ 代, 再经过连续 5 年的严格自交选育获得的新品种。该品种具有生长速度快、耐高温、色泽浓褐、个体宽大等性状。但从第 8 代起自交后, 其性状逐渐退化。我们推测由于受多基因控制, 海带杂交后从 F₂ 代起就有目标性状分离, 因此有必要对海带“901”的遗传和变异的机理进行研究, 以期对海带的选种和育种有理论的指导意义。本研究采用海带“901”品系的配子体为材料, 通过对 PCR 扩增条件和 RAPD 反应程序的优化, 得到海带“901”配子体 DNA 重复和稳定的 RAPD 图谱。为深入研究海带“901”的遗传及变异, 获得与其优良生产性状相关的特异性标记打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

海带“901”配子体来自烟台东方海洋开发有限公司, 置于 4℃ 条件下保存。用于 PCR 扩增的 10 bp 随机引物购自上海生物工程公司, 从 200 条随机引物中筛选出 14 条引物用于 PCR 扩增检测: S7 (GGTGACGCAG), S17 (AGGGAACGAG), S27 (GAAA - CGGGTG), S30 (GTGATCGCAG), S39 (CAAACGTCGG), S51 (AGCGCCATTG), S55 (CATCCGTGCT), S56 (AGG - GCGTAAG), S60 (ACCCGGTCAC), S80 (ACTTCGCCAC), S104 (GGAAGTCGCC), S105 (AGTCGTCCCC), S112 (AC - GCGCATGT), S376 (GAGCGTCGAA)。Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自美国 Promega 公司, Agarose I 及 Gene Ruler 100 bp DNA marker (MBI) 购自上海生物工程公司。

^{*} 国家高技术研究发展计划项目 2001AA621090 号和教育
部留学回国资助计划课题资助。

第一作者: 夏鹏, 出生于 1977 年, 硕士生。主要从事海洋生物学研究。Email: xia peng27@163.com

^{**} 通讯作者。

收稿日期: 2003-01-23; 修回日期: 2003-02-18

1.2 配子体提取 DNA

根据 Patway 方法改进^[7], 取约 0.1 g 湿质量配子体材料, 经过滤和凉干, 加 1.5 mL 提取缓冲液 (2 % CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris · HCl, 2 % 巯基乙醇) 室温下研磨至糊状, 65 ℃ 水浴 1 h, 用等体积的氯仿 - 异丙醇 (24 : 1) 抽提 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用 0.6 倍体积的异丙醇沉淀。12 000 r/min 离心去上清液。加入 200 mL TE 缓冲液, 2 mL 10 g/L RNA 酶 37 ℃ 水浴 1 h。重复氯仿 - 异丙醇抽提及异丙醇沉淀步骤。用 70 % 乙醇洗涤沉淀, 阴干。用灭菌的去离子水溶解干燥后的 DNA, 在型号为 Biophotometer 的 DNA 定量仪 (德国 Eppendorf 公司) 上检测 DNA 的纯度和浓度, 所测 OD_{260/280} 值在 1.6~1.8 之间。

1.3 PCR 扩增反应体系优化

用于本实验 25 μL 的 PCR 反应体系组成: 1×PCR buffer (100 mmol/L KCl, 80 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris · HCl, pH 9.0, NP-40), 模板 DNA, MgCl₂, 引物, dNTP, Taq 酶 (Promega 公司), 反应体系组分参

照表 1。

表 1 PCR 扩增反应组分的优化

Tab.1 Optional conditions for PCR ingredients

模板 DNA(ng)	MgCl ₂ (mmol/L)	引物浓度 (μmol/L)	dNTP 浓度 (mmol/L)	Taq 酶浓度 (U)
20	1.00	0.05	0.05	0.50
50	1.50	0.10	0.10	1.00
80	2.00	0.15	0.15	1.50
100	2.50	0.20	0.20	2.00
120	3.00	0.25	0.25	2.50
150		0.30		
最适条件				
50	2.00	0.20	0.20	1.50

1.4 PCR 反应扩增程序的优化

PCR 反应在型号为 Mastercycler gradient 的 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司) 上进行, PCR 反应优化程序参照表 2。

1.5 产物鉴定

表 2 PCR 扩增程序的优化

Tab.2 Optional reaction conditions for PCR amplification

退火温度(℃)	退火时间(s)	延伸温度(℃)	延伸时间(s)	(预)变性温度(℃)	变性时间(s)	循环次数(次)
35	60	66	60	89	30	38
36	90	68	120	91	60	40
37	120	70	180	92	90	45
38		72		94		
39		74		95		
40		76		97		
		78		98		
		80		99		
最适条件						
36	60	72	120	94	30	45

扩增产物在 1.5 % 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 中电泳, 电泳缓冲液为 1×TAE (1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris · HCl, pH 8.0), 电压 4 V/cm 电泳, 2 h 后, 将电泳胶置于凝胶成像系统下 (Image Master VDS, Pharmacia 公司) 观察并记录结果。

2 结果和讨论

2.1 模板 DNA 浓度

本研究表明, 模板 DNA 浓度对 PCR 反应有影响, 50~150 ng 模板 DNA 能产生较好的扩增带。选择海带“901”F₇ 代雌配子体作为模板 DNA, 在模板 DNA

低浓度扩增, 带型模糊甚至缺失; 而在 50 ng 以上时, 带型稳定清晰, 为了使外来因素减少到最小, 最终选用 50 ng 作为模板 DNA 为的量。

2.2 MgCl₂ 浓度

Taq DNA 聚合酶需要 Mg²⁺ 激活^[8], 由于 PCR 反应中模板双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响, Mg²⁺ 浓度太低难以产生 PCR 产物, 而且错配率增加, 导致非特异性扩增产物的出现。因此, 需要确定扩增反应的最佳 Mg²⁺ 浓度。一般认为 Mg²⁺ 浓度为 1.0~2.0 mmol/L^[9]。本研究表明 Mg²⁺ 浓度在 1.5~2.0 mmol/L 效果较好 (见图 1b), 最终选用 2.0

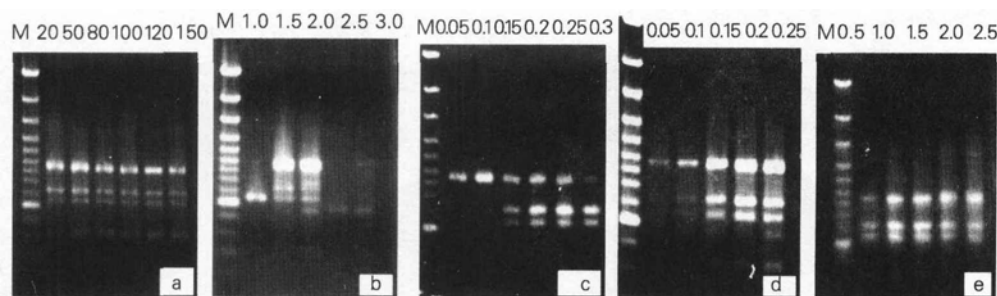


图1 PCR 扩增反应组分的优化

a. 模板浓度梯度(ng); b. $MgCl_2$ 浓度梯度(mmol/L); c. 引物浓度梯度(μ mol/L); d. dNTP 浓度梯度(mmol/L); e. Taq 酶浓度梯度(U)

Fig. 1 Optional conditions for PCR ingredients

a. Template DNA concentration(ng); b. Concentration of $MgCl_2$ (mmol/L); c. Primer concentration(μ mol/L); d. dNTP concentration(mmol/L); e. Taq enzyme concentration

mmol/L 作为反应的 Mg^{2+} 浓度。

2.3 随机引物浓度

由图 1c 所示, 引物浓度低于 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时, 出现带型缺失, 到 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 的浓度时, 带型出现模糊。在 $0.15 \sim 0.25 \mu\text{mol/L}$ 间能产生稳定的带, 最终选用 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 作为 PCR 反应的随机引物浓度。

2.4 dNTP 浓度

一般而言, dNTP 的浓度为 $0.05 \sim 0.20 \text{ mmol/L}$ ^[10], 过高的 dNTP 浓度会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性, 过低也会使 PCR 扩增产率降低。本试验结果表明, 低于 0.1 mmol/L 时, 带型模糊; 而在 $0.15 \sim 0.25 \text{ mmol/L}$ 范围内, 带型清晰, 最终选用 0.2 mmol/L 作为 dNTP 的适宜浓度。

2.5 Taq DNA 聚合酶浓度

一般来讲 Taq DNA 聚合酶在 $25 \mu\text{L}$ 反应体系中的一般用量是 $1 \sim 2.5 \text{ U}$ ^[11]。本研究表明(图 1e), 在 0.5 U 时带型虽然不缺失但模糊, 在 $1.0 \sim 2.5 \text{ U}$ 时靶序列的质量基本无差别, 最后选择 1.5 U 作为酶的适量。

综上所述, 用于海带配子体 PCR 扩增反应体系最终确定为: $1 \times \text{PCR buffer}$ (100 mmol/L KCl , $80 \text{ mmol/L (NH}_4)_2\text{SO}_4$, $100 \text{ mmol/L Tris} \cdot \text{HCl}$, pH 9.0, NP-40), 50 ng 模板 DNA, $2.0 \text{ mmol/L MgCl}_2$, 0.2 mmol/L dNTP , $0.2 \mu\text{mol/L}$ 引物, 1.5 U Taq 酶 。

2.6 退火温度和时间

试验结果表明 $36 \sim 37^\circ\text{C}$ 范围内, 带型稳定清晰, 作者选用 36°C 为适宜的退火温度, 在此条件下进行退火时间的研究, 结果表明在 60 s 时带型完整清晰, 90 s

以上时, 小片段的带型模糊并出现缺失, 最终选用 60 s 为最佳退火时间。

2.7 延伸温度和时间

选择最接近 Taq 酶的最适作用温度和时间^[11]。在 $66 \sim 80^\circ\text{C}$ 范围内, 随着温度的升高, PCR 扩增的大片断逐渐减少, 小片断却在增加。在 72°C 时带型完整(图 2c,d), 最终选择延伸温度为 72°C , 并以 120 s 做延伸时间。

2.8 预变性和变性温度和变性时间

本实验选用 94°C 作为反应的预变性和变性温度(如图 2)。在 94°C 下确定的变性时间为 30 s (图 2e,f), 所得到的 PCR 扩增结果较好。

2.9 循环次数

循环次数对 PCR 扩增结果有影响^[12], 本实验结果表明, 38 次循环所产生的带较弱, 40 个循环所产生带型基本稳定, 选用 45 个循环作为扩增的循环次数。

综上所述得出 PCR 优化扩增程序: 94°C , 5 min ; 94°C , 30 s , 36°C , 1 min , 72°C , 2 min , 45 个循环; 72°C 延伸 10 min 。

3 优化反应体系和扩增程序的检验

以海带“901” F_7 代的雌配子体为材料, 提取 DNA, 以引物 S27, S30, S31, S37, S39, S76, S80, S51, S55, S56, S104, S105, S112, S119, S376, S383, S396 按照以上优化的反应体系及反应条件, 进行实验, 所得结果见图 3a。

其后, 用海带“901”品系的父本、母本; F_6 代的雄、

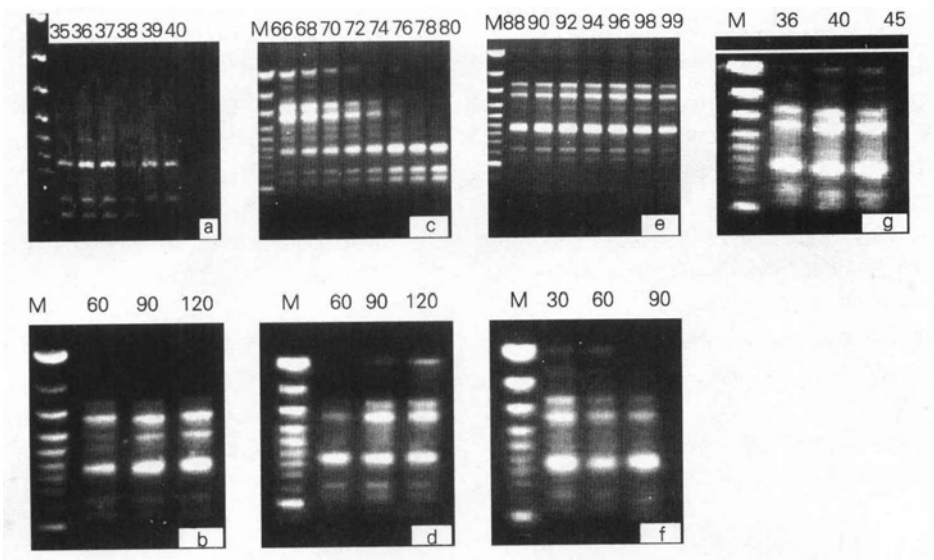


图 2 PCR 扩增程序的优化

a. 退火温度(℃); b. 退火时间(s); c. 延伸温度(℃); d. 延伸时间(s); e. 变性温度(℃); f. 变性时间(s); g. 循环次数

Fig. 2 Optional reaction conditions for PCR amplification

a. Annealing temperature (℃); b. Annealing time (s); c. Extending temperature (℃); d. Extending time (s); e. Denaturalization temperature (℃); f. Denaturalization time (s); g. Cycling times

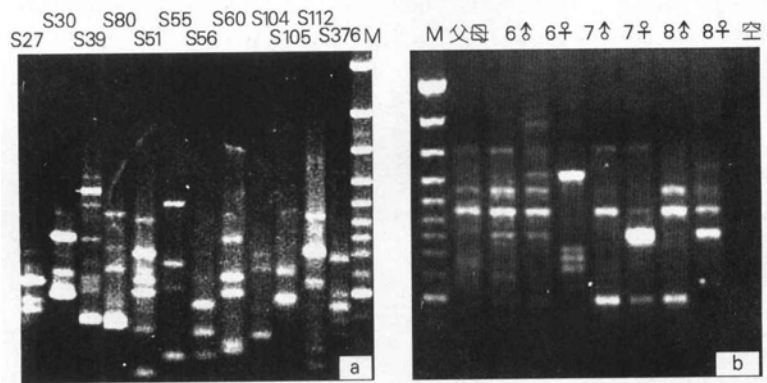


图 3 用优化条件扩增出的 RAPD 条带

a. 以 7♀ 为模板用不同引物进行检验; b. 以 S7 为引物, 用不同的模板进行扩增

Fig. 3 RAPD patterns with optimal reaction conditions

a. RAPD patterns of 7♀ template DNA with different primers; b. RAPD patterns of S7 primer with different template DNA

雌配子体; F₇ 代的雄、雌配子体; F₈ 代雄、雌配子体为材料, 提取模板 DNA。再随机选用引物 S7, S17 同样条件进行试验, 所得的结果稳定(图 3b, c)。由此证明本

研究方法可用于海带“901”配子体 DNA 的提取及 PCR 扩增, 这为深入研究海带“901”品系的遗传和变异提供了方法依据。

参考文献

- 1 夏 铭, 栾非时, 李景鹏. RAPD 影响因素的研究及试验条件的优化. 植物研究, 1999, 19(2): 195-200
- 2 赫英俊, 段德麟. RAPD 技术及其在藻类学研究中的应用. 海洋科学, 2001, 25(6): 14-16
- 3 贾建航, 王 萍, 金德敏, 等. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用. 植物学报, 2000, 42(4): 403-407
- 4 李文红, 段德麟, 王如才. 分子标记在藻类遗传资源研究中的应用. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(增刊): 295-299
- 5 He Y J, Zou Y P, Wang D L, et al. Assessing the gemplasm of *Laminaria* (Phaeophyta) with random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Chin J Oceanol & Limnol, 2003, 21(2): 193-200
- 6 张全胜, 刘升平, 曲善村, 等. “901” 海带新品种培育的研究. 海洋湖沼通报, 2001(2): 46-53
- 7 Patwary M U, Ron M M. Revealing genetic markers on *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. J Phycol, 1993, 19(2): 216-222
- 8 胡远皆, 周志刚. 海带孢子体 DNA 随机扩增反应条件优化. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 193-198
- 9 李钧敏, 金则新, 柯世省. 濒危植物七子花 RAPD 条件的优化. 植物学通报, 2002, 19(4): 452-456
- 10 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东, 等. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 30-47
- 11 甘四明, 施季森. Idaho Rapidcycler PCR 仪上用薄壁管进行 RAPD 扩增的程序优化. 南京林业大学学报, 2000, 24(1): 27-31
- 12 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究. 动物学研究, 18(2): 221-227

OPTIMIZATION OF RANDOMLY AMPLIFIED REACTION CONDITIONS FOR GAMETOPHYTE DNA OF *Laminaria* “901” STRAIN

XIA Peng^{1,2} YANG Ying-Xia³ LIU Sheng-Ping³ ZHAO Yu-Shan³ DUAN De-Lin¹

(¹ Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

(³ Yantai Oriental Ocean Developmental Co., Ltd. Yantai, 265618)

Received: Jan., 23, 2003

Key Words: *Laminaria* “901” strain, Gametophyte, RAPD, Genomic DNA

Abstract

Genomic DNA was isolated from the gametophyte of *Laminaria japonica* “901” strain using improved small-scale method, and it exhibited reproducible and stable patterns with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) reaction. The ingredients and programs for amplified reactions were optimized respectively, and it resulted in 50 ng template DNA, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L primer, and 1.5 U/25 μL Taq DNA polymerase. In addition, the optimized reaction condition concluded was that predenaturation 94 °C, 5 min; 30 s 94 °C; annealing 1 min 36 °C; elongation 2 min, 72 °C; 45 cycles; finally holding 10 min at 72 °C. Our testified methods could yield satisfactory RAPD patterns, and it provided methods for further studying the mechanism of inheritance and variation to *Laminaria* “901” strain.

(本文编辑: 刘珊珊)